昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, August 2016, 59(8): 839－845 doi:10.16380/j.kcxb.2016.08.005

黄皮种子提取物对斜纹夜蛾幼虫的杀虫活性及有效成分鉴定

郭成林[1,2]，覃柳燕[3]，万树青[1,*]，马跃峰[2]，覃建林[2]，马永林[2]

（1. 华南农业大学，农药与化学生物学教育部重点实验室，广州 510642；2. 广西农业科学院植物保护研究所，广西作物病虫害生物学重点实验室，南宁 530007；3. 广西农业科学院生物技术研究所，南宁 530007）

摘要：【目的】测定黄皮 *Clausena lansium* 种子提取物对斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫的拒食活性，对有效成分进行分离、鉴定，并进一步测定其拒食活性、生长发育抑制活性及细胞毒性，为筛选斜纹夜蛾生态防治植物源杀虫剂提供依据。【方法】采用叶蝶法测定黄皮种子甲醇提取物及其石油醚、乙酸乙酯、正丁醇和水 4 种溶剂萃取物对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的非选择性拒食活性和生长发育抑制活性；用硅胶柱层析进行石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物拒食活性成分分离；用核磁共振谱(NMR)进行拒食有效成分结构鉴定；用 MTT 法测定拒食活性成分对 SL 细胞毒性。【结果】黄皮种子甲醇提取物对斜纹夜蛾 3 龄幼虫具有较强的拒食活性，活性成分主要分布于石油醚相和乙酸乙酯相中；石油醚相和乙酸乙酯相经硅胶柱层析分离得 10 个馏分，以黄色晶体馏分 2 的拒食活性最强；经分离纯化及核磁共振氢谱和碳谱鉴定，黄皮新肉桂酰胺 B(lansiumamide B)为主要的拒食活性成分，对斜纹夜蛾 3 龄幼虫 48 h 拒食中浓度为 214.95 μg/mL，同时具有较强的细胞毒性，对 SL 细胞 48 h 抑制中浓度为 10.09 μg/mL。【结论】黄皮种子提取物对斜纹夜蛾幼虫具有较强的拒食活性及细胞毒性，黄皮新肉桂酰胺 B 是主要活性成分之一，作为植物源杀虫剂开发具有较好的发展前景。

关键词：斜纹夜蛾；黄皮；提取物；新肉桂酰胺 B；拒食活性；细胞毒性

中图分类号：Q965.9　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2016)08-0839-07

Insecticidal activity and identification of the active ingredients of *Clausena lansium* seed extracts against larval *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae)

GUO Cheng-Lin[1,2], QIN Liu-Yan[3], WAN Shu-Qing[1,*], MA Yue-Feng[2], QIN Jian-Lin[2], MA Yong-Lin[2]

(1. Key Laboratory of Natural Pesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; 3. Institute of Biotechnology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

Abstract:【Aim】By measuring the antifeedant activities of extracts from *Clausena lansium* seeds against *Spodoptera litura* larvae as well as separating and identifying the active ingredients and measuring the antifeedant activity, development deterrent activity and cytotoxicity, this study aims to provide references for screening botanical pesticides for ecological management of *S. litura*.【Methods】Leaf disc method was used to determine the no-choice antifeedant activities of methanol extract of *C. lansium* seeds and

基金项目：广西自然科学基金项目(2013GXNSFAA019061)；广西作物病虫害生物学重点实验室基金项目(13-051-47-ST-9)

作者简介：郭成林，男，1976 年 6 月生，广西苍梧人，博士，助理研究员，主要从事植物源农药研究，E-mail：guochenglin0278@126.com

* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: wanshuqing@scau.edu.cn

收稿日期 Received：2016-02-22；接受日期 Accepted：2016-07-18

extracts of other four solvents (petroleum ether, ethyl acetate, n-butanol and water) as well as the developmental inhibitory activity against the 3rd instar larvae of *S. litura*. Silica column chromatography was used to separate the active antifeedant ingredients of petroleum ether and ethyl acetate extracts. Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) was used to identify the structure of active antifeedant compound, and MTT method was used to determine the cytotoxicity of antifeedant compound to *S. litura* cell lines. 【Results】The methanol extract of *C. lansium* seeds exhibited strong antifeedant activity against the 3rd instar larvae of *S. litura*. The active ingredients were mainly distributed in petroleum ether extracts and ethyl acetate extracts. Extracts of petroleum ether and ethyl acetate were fractioned with silica column chromatography and 10 fractions were collected then. Fraction 2, a yellow crystal, showed the highest antifeedant activity. Through isolation, purification and ^{1}HNMR and ^{13}CNMR analyses, lansiumamide B was identified to be the main active ingredient, with the 48 h median antifeedant concentration (AFC_{50}) of 214.95 μg/mL against the 3rd instar larvae of *S. litura*. This ingredient also displayed high cytotoxicity to the 3rd instar larvae of *S. litura*, with the 48 h cell medium inhibition concentration value of 10.09 μg/mL. 【Conclusion】Extracts from *C. lansium* seeds have strong antifeedant activities and cytotoxicity against *S. litura* larvae. Lansiumamide B is one of the main active ingredients of the extracts, suggesting its good application prospect as a botanical insecticide.

Key words: *Spodoptera litura*; *Clausena lansium*; extract; lansiumamide B; antifeedant activity; cytotoxicity

斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 是鳞翅目(Lepidoptera)夜蛾科(Noctuidae)的一种杂食性世界性害虫,危害植物达 99 科 209 种(程东美和张志祥, 2003)。在我国南方地区,斜纹夜蛾在莲藕、芋头、花生、蔬菜、香蕉等作物上为害较为严重,取食量大、繁殖能力强,通过幼虫啃食叶片、排泄污染粪便和造成感病伤口等造成巨大的经济损失。目前生产上一般采用甲维盐、阿维菌素或类似的化学药剂进行防治,但斜纹夜蛾幼虫耐药性强,隐蔽性好,防治效果往往不理想。人们一般通过加大用药量或缩短施药周期来减轻危害,但由此造成的害虫抗药性、再猖獗和农药残留等问题日益突出。因此,减少常规化学农药使用,寻找新的生态防治方法成为斜纹夜蛾防治的关键。植物在与食植昆虫长期协同进化过程中,产生了许多具有特殊生物活性的次生代谢物质(钦俊德和王琛柱, 2001)。这些次生代谢物种类繁多、结构新颖、作用机理独特、作用方式多样,从中筛选安全高效的杀虫活性成分加以开发利用是害虫生态防治的有效途径之一。

黄皮 *Clausena lansium* 是原产我国的芸香科黄皮属热带亚热带果树,在广东、广西、福建、海南、云南等南方地区广泛栽培种植。据本实验室研究发现,黄皮种子提取物对多种农林和卫生害虫有较强的生物活性,其中对萝卜蚜 *Lipaphis erysimi* 具有一定的杀灭作用(万树青和郑大睿, 2005),对米象 *Sitophilus oryzae*(张瑞明等, 2011a)、茶黄蓟马 *Scirtothrips dorsalis*(张瑞明等, 2011b)、松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus*(马伏宁, 2009)和淡色库蚊 *Culex pipiens* 幼虫(Han *et al*., 2013)有较强的毒杀作用,对朱砂叶螨 *Tetranychus cinnabarinus* 有较好的毒杀、驱避和产卵抑制活性(张瑞明等, 2013),作为植物杀虫剂研发具有较好的前景。但目前尚未有关黄皮种子提取物对斜纹夜蛾杀虫活性的研究报道。因此,本研究测定了黄皮种子提取物对斜纹夜蛾幼虫的拒食活性,对活性成分进行了分离、鉴定并进一步对其细胞毒性及拒食活性大小进行了评价,为丰富斜纹夜蛾生态防治内容及黄皮种子杀虫活性物质开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试植物:黄皮种子,购于广州市清平中药材市场。

供试药剂:甲醇、丙酮和正丁醇,成都市科龙化工试剂厂;乙酸乙酯和石油醚(60~90℃),天津市化学试剂一厂;无水碳酸钠,广州新建精细化工厂;薄层层析硅胶板(GF254 型)和柱层析硅胶,青岛海洋化工厂;96% 鱼藤酮原药,华南农业大学农药与化学生物学教育部重点实验室;二甲基亚砜(DMSO),广州化学试剂厂;3-(4, 5 二甲基噻唑)-2, 5 二苯基四氮唑(MTT),美国 Sigma-Aldrich 公司;水解乳蛋

白和 Grace 氏培养基,美国 Invitrogen 公司;酵母提取物,英国 Oxoid 公司;胎牛血清,Gibco 公司。

供试昆虫:斜纹夜蛾幼虫。从广州市郊的芋头叶上采集斜纹夜蛾卵块,在生化培养箱(温度 25 ±1℃,光周期 14L∶10D,相对湿度 70%)的条件下用蓖麻叶进行饲养,挑取个体大小一致的 3 龄幼虫供试。

斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞系(SL 细胞系):引自华中师范大学,由华南农业大学天然农药与化学生物学教育部重点实验室传代培养,培养基为 Grace 氏昆虫细胞培养基,加适量酵母提取物和水解乳蛋白,培养温度为 27℃。

1.2　提取物的提取及萃取分离

黄皮种子用植物粉碎机粉碎,加入 5 倍体积(v/w)的甲醇避光浸提 48 h,减压过滤,滤渣加入甲醇继续浸提,反复 3 次,合并提取液,经旋转蒸发仪减压浓缩至干,即得黄皮种子甲醇提取物。

黄皮甲醇提取物用适量的甲醇溶解,加入蒸馏水悬浮,采用液-液萃取分离法在分液漏斗中先后用石油醚、乙酸乙酯和正丁醇分别萃取 3 次,将相同溶剂萃取液进行合并,加入适量的无水碳酸钠去除水分,旋转蒸发仪减压浓缩至干,得石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物和水萃取物,置 4℃冰箱中保存备用。

1.3　活性成分硅胶柱层析分离及结构鉴定

合并石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物,用少量石油醚溶解,加入 2.5 倍量硅胶拌胶,然后装入 20 倍量的硅胶层析柱(100 ~200 目),分别使用石油醚∶乙酸乙酯 =1∶0, 9∶1, 4∶1, 2∶1, 1∶1, 1∶2, 1∶4, 1∶8 和 0∶1(v/v)作为系列洗脱剂进行柱层析分离,每 250 mL 接收馏分,点样于 GF254 硅胶薄板,碘、荧光和硫酸显色后合并相近的馏分,共得 10 个馏分。对活性较高的馏分用相同方法在 30 倍量的 200 ~300 目硅胶层析柱重新分离一次。

用核磁共振氢谱(^{1}HNMR)、核磁共振碳谱(^{13}CNMR)对分离到活性较高的成分进行测定化合物光图谱,以氯仿为溶剂。

1.4　黄皮提取物对斜纹夜蛾拒食活性及生长发育抑制活性测定

采用叶碟法(凌冰等, 2008)。将黄皮种子提取物加入少量甲醇溶解,加入 1% 体积的吐温-80 乳化,再用双蒸水稀释成不同处理浓度,其中甲醇提取物及其萃取分离物的处理浓度为 10 mg/mL,硅胶柱层析分离物的处理浓度为 1 mg/mL,馏分 2 的拒食及生长发育抑制活性测定处理浓度为 12.5, 25, 50, 100, 200 μg/mL,黄皮新肉桂酰胺 B 的拒食活性测定处理浓度为 75, 150, 300, 600, 1 200 μg/mL。在直径为 9 cm 的培养皿中垫一张定性滤纸,加少量蒸馏水保湿。将新鲜蓖麻 *Ricinus communis* 叶用圆形打孔器打成直径为 1.2 cm 的叶碟,放到各供试样品的稀释液中浸泡 5 s,晾干,摆入培养皿中,每皿摆放 10 片叶碟。每处理 10 个重复,以 1% 吐温-80 水溶液为空白对照。每皿放入 1 头饥饿 4 h 的斜纹夜蛾 3 龄幼虫,生长发育抑制活性测定分别称量并记录接入时及处理后 48 h 的虫体重量;拒食活性测定在处理后 48 h 用方格坐标蜡纸测定试虫取食面积,按以下公式计算拒食率和体重增长抑制率。

$$拒食率(\%) = \frac{对照取食叶面积 - 处理取食叶面积}{对照取食叶面积} \times 100;$$

$$体重增长抑制率(\%) = \frac{对照平均增重 - 处理平均增重}{对照平均增重} \times 100。$$

1.5　拒食活性成分对 SL 细胞的毒力测定

采用 MTT 法(张志祥等, 2000)。取对数生长期的 SL 细胞,细胞量为 1×10^6 个/mL,接种 96 孔细胞培养板,每孔各加入 100 μL 细胞悬浮液,培养 24 h 后加入 2.5, 5.0, 10.0, 15.0, 20.0 μg/mL 的黄皮新肉桂酰胺 B DMSO 溶液,对照组加等量的溶剂(DMSO),每处理 4 重复,另以对 SL 细胞活性抑制较强的物质——鱼藤酮为对照药剂,处理浓度为 20.0 μg/mL。置于 28℃培养箱下培养 48 h,再加入 5 μg/mL 的 MTT 溶液反应 4 h,弃培养液,PBS 洗涤 1 次,加入助溶剂酸化异丙醇,混匀至活细胞与 MTT 形成的紫色结晶完全溶解后,置于酶标仪上,读取 OD_{570} 值。按下式计算细胞死亡率,然后计算抑制中浓度(IC_{50}):

$$死亡率(\%) = \frac{对照\ OD_{570}值 - 处理\ OD_{570}值}{对照\ OD_{570}值} \times 100。$$

1.6　数据统计分析

数据采用 DPS 6.55 软件进行 Duncan 氏新复极差法显著性分析及生物活性分析。

2　结果

2.1　黄皮种子甲醇提取物及其萃取分离物对斜纹夜蛾幼虫的拒食活性

表 1 结果显示,黄皮甲醇提取物对斜纹夜蛾 3 龄幼虫表现出较强的拒食活性,在 10 mg/mL 浓度

下,24 h 非选择性拒食率为 75.8%。在 4 种不同极性溶剂萃取物中,石油醚萃取物的拒食活性最强,24 h 拒食率达 93.2%;其次为乙酸乙酯萃取物,拒食率为 89.9%;正丁醇萃取物和水萃取物的拒食活性较差,拒食率分别为 36.3% 和 16.0%。该结果表明,黄皮种子提取物对斜纹夜蛾幼虫的拒食活性成分主要分布在石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物中。

表 1 黄皮种子提取物对斜纹夜蛾 3 龄幼虫拒食活性

Table 1 Antifeedant activities of extracts from *Clausena lansium* seeds against the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

提取物 Extract	浓度 Concentration (mg/mL)	平均取食面积 Average feeding area (mm^2)	拒食率 Antifeedant rate (%)
甲醇提取物 Methanol extract	10	125.6 ± 7.2	75.8 b
石油醚萃取物 Petroleum ether extract	10	35.3 ± 1.7	93.2 a
乙酸乙酯萃取物 Ethyl acetate extract	10	52.4 ± 3.2	89.9 a
正丁醇萃取物 N-Butanol extract	10	340.1 ± 18.4	36.3 c
水萃取物 Water extract	10	435.6 ± 11.5	16.0 d
1% Tween-80 (CK)	–	518.4 ± 8.3	–

表中的数据为各重复平均值 ± 标准差,同列数字后不同小写字母表示 Duncan 氏新复极差法检验 0.05 水平差异显著;下表同。Data in the table are mean ± *SD*. Data in the same column followed by different lowercase letters are significantly different by Duncan's new multiple range method test ($P < 0.05$). The same for the following tables.

2.2 黄皮种子硅胶柱层析分离物对斜纹夜蛾幼虫的拒食活性

将石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物进行合并,经柱层析分离共得到 10 个馏分。不同馏分对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的 24 h 非选择性拒食活性测定结果显示,在 10 个馏分中,以馏分 2(黄色晶体状物质)对斜纹夜蛾幼虫的拒食活性最高,在 1 mg/mL 浓度下,24 h 拒食率为 93.7%;其次是馏分 1 和馏分 3,拒食率分别为 67.8% 和 51.7%;其他馏分活性较低,24 h 拒食率均低于 35%(表 2)。

2.3 馏分 2 不同成分对斜纹夜蛾幼虫的拒食活性

对馏分 2 继续进行硅胶柱层析分离,共分离到 3 个成分。不同成分对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的 24 h 非选择性拒食活性结果差异显著,其中成分 3 对斜纹夜蛾幼虫具有较强的拒食活性,在 1 mg/mL 浓度下,24 h 非选择性拒食率为 79.3%;成分 1 和成分 2 对斜纹夜蛾幼虫拒食活性差或无活性,24 h 拒食率低于 10%。成分 3 与同药量的馏分 2 相比,拒食活性不升反降,说明了黄皮种子提取物对斜纹夜蛾幼虫的拒食作用是多成分共同作用的结果,成分 1 和成分 2 单一使用对斜纹夜蛾幼虫拒食活性差,但可能对成分 3 具有协同增效作用(表 3)。

表 2 硅胶柱层析分离物对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的拒食活性

Table 2 Antifeedant activities of fractions from silica gel chromatography separation against the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

提取物 Extract	浓度 Concentration (mg/mL)	平均取食面积 Average feeding area (mm^2)	拒食率 Antifeedant rate (%)
馏分 1 Fraction 1	1	142.8 ± 4.4	67.8 b
馏分 2 Fraction 2	1	27.9 ± 1.9	93.7 a
馏分 3 Fraction 3	1	214.2 ± 12.2	51.7 c
馏分 4 Fraction 4	1	296.9 ± 12.6	33.1 d
馏分 5 Fraction 5	1	312.9 ± 13.9	29.5 d
馏分 6 Fraction 6	1	352.7 ± 11.0	20.5 e
馏分 7 Fraction 7	1	378.3 ± 16.6	14.7 e
馏分 8 Fraction 8	1	455.8 ± 13.5	–2.8 f
馏分 9 Fraction 9	1	428.3 ± 15.5	3.5 f
馏分 10 Fraction10	1	356.9 ± 13.4	19.5 e
1% Tween-80 (CK)	–	443.6 ± 13.8	–

表 3 3 种成分对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的拒食活性

Table 3 Antifeedant activities of 3 ingredients against the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

处理 Treatment	浓度 Concentration (mg/mL)	平均取食面积 Average feeding area (mm^2)	拒食率 Antifeedant rate (%)
成分 1 Ingredient 1	1	491.0 ± 15.0	–7.6 d
成分 2 Ingredient 2	1	413.1 ± 9.9	9.5 c
成分 3 Ingredient 3	1	94.3 ± 3.7	79.3 b
馏分 2 Fraction 2	1	39.9 ± 3.0	91.3 a
1% Tween-80 (CK)		456.2 ± 8.6	

2.4 成分 3 的结构鉴定

通过理化性质及光谱数据分析对成分 3 进行了鉴定,结果显示,成分 3 为淡黄色结晶,254 nm 紫外灯下荧光显色和碘显色呈现明显斑点,365 nm 紫外灯下不显色,香兰素烤板无变化,硫酸烤板淡黑色(紫色)。其波谱数据归属如下:^{1}H NMR ($CDCl_3$, 600 MHz): δ 7.63 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-7), 6.93 (1H, d, J = 15.6 Hz, H-8), 6.49 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-10), 6.24 (1H, d, J = 9.0 Hz, H-11), 3.07 (3H, s, -NCH_3), 7.21 – 7.44 (10H, m, Ar-H); ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 150 MHz): δ 134.3 (C-1), 128.6 (C-2), 128.7 (C-3), 127.9 (C-4), 128.7

(C-5), 128.6 (C-6), 142.6 (C-7), 118.2 (C-8), 166.5 (C-9), 129.6 (C-10), 125.0 (C-11), 135.1 (C-12), 128.6 (C-13), 128.7 (C-14), 127.9 (C-15), 128.7 (C-16), 128.6 (C-17), 34.4(-NCH_3)。

上述数据与文献(Lin, 1989;马伏宁等,2009)报道的黄皮新肉桂酰胺 B(lansiumamide B)数据一致,故鉴定化合物 3 为黄皮新肉桂酰胺 B,其分子式为 $C_{18}H_{17}NO$,化学结构图见图 1。

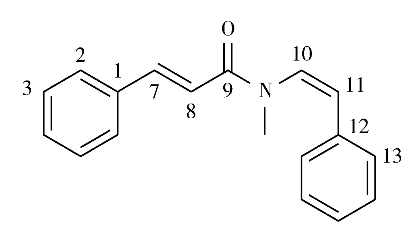


图 1　黄皮新肉桂酰胺 B 的化学结构图

Fig. 1　Chemical structure of lansiumamide B

2.5　黄皮种子拒食活性成分对斜纹夜蛾幼虫的拒食及生长发育抑制作用

以馏分 2 作为处理药剂,测定了不同处理浓度下对斜纹夜蛾 3 龄幼虫的非选择性拒食效果及对生长发育的影响。结果发现(表 4),馏分 2 对斜纹夜蛾幼虫的拒食率及体重增长抑制率与处理药量成正比,随着处理药量的增大,斜纹夜蛾幼虫的取食量和体重增加量显著降低,使用 50.0, 100 和 200 μg/mL 浓度,48 h 非选择性拒食率分别为 45.62%, 71.27% 和 89.23%,体重增长抑制率分别为 56.56%, 66.10% 和 93.22%。馏分 2 还可引起斜纹夜蛾幼虫发育时间延长,蛹重下降,化蛹率、羽化率和产卵率降低,形成畸形蛹或成虫翅膀发育不全等(图 2)。

表 4　馏分 2 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫非选择性拒食及生长发育抑制作用

Table 4　Antifeedant and developmental inhibitory effects of fraction 2 on the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

浓度(μg/mL) Concentration	拒食率(%) Antifeedant rate	体重增长抑制率(%) Inhibition rate of body weight gain
12.5	1.57 ± 5.11 d	6.93 ± 8.85 e
25.0	8.95 ± 2.17 d	16.77 ± 3.17 d
50.0	45.62 ± 1.64 c	56.56 ± 2.70 c
100.0	71.27 ± 1.72 b	66.10 ± 1.12 b
200.0	89.23 ± 1.74 a	93.22 ± 0.25 a









图 2　馏分 2 对斜纹夜蛾生长发育的影响

Fig. 2　Effects of fraction 2 on the growth and development of *Spodoptera litura*

2.6　黄皮新肉桂酰胺 B 对斜纹夜蛾幼虫的拒食活性及 SL 细胞的细胞毒性

非选择性拒食活性测定结果表明(表 5),黄皮新肉桂酰胺 B 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫有较强的拒食活性,拒食率大小与处理药量成正比,48 h 拒食中浓度为 214.95 μg/mL。细胞毒性结果显示(表 6),黄皮新肉桂酰胺 B 同时有较强的细胞毒性,随着处理药量的加大,SL 细胞的死亡率显著提高,在 20 μg/mL 浓度下,48 h SL 细胞的相对死亡率为 74.33%,显著高于同药量鱼藤酮处理的相对死亡率;48 h 细胞抑制中浓度为 10.09 μg/mL。

表 5　黄皮新肉桂酰胺 B 对斜纹夜蛾 3 龄幼虫非选择性拒食活性

Table 5　Antifeedant activity of lansiumamide B against the 3rd instar larvae of *Spodoptera litura*

浓度 Concentration (μg/mL)	拒食率 Antifeedant rate (%)	AFC_{50} (95% FL) (μg/mL)	毒力回归方程 Toxicity regression equation
75	26.09 ± 3.45 e	214.95 (171.89 – 268.79)	$y = 1.6593 + 1.4323x$ ($r = 0.9823$)
150	35.19 ± 3.40 d		
300	64.80 ± 2.68 c		
600	75.93 ± 3.05 b		
1 200	83.53 ± 2.42 a		

AFC_{50}: 拒食中浓度 Median antifeedant concentration; FL: 置信限 Fiducial limit.

表 6　黄皮新肉桂酰胺 B 对 SL 细胞的细胞毒性

Table 6　Cytotoxicity of lansiumamide B to SL cells

处理 Treatment	浓度 Concentration (μg/mL)	48 h 死亡率 48 h Mortality (%)	IC_{50} (95% FL) (μg/mL)
黄皮新肉桂酰胺 B Lansiumamide B	2.5	5.96 e	10.09 (9.44 – 10.78)
	5.0	24.75 d	
	10.0	50.24 c	
	15.0	68.42 a	
	20.0	74.33 a	
鱼藤酮 Rotenone	20.0	59.42 b	

IC_{50}: 抑制中浓度 Medium inhibitory concentration; FL: 置信限 Fiducial limit.

3 讨论

植物源拒食剂主要通过阻止害虫取食和产卵、抑制害虫生长发育来保护作物生产安全,对天敌和非靶标生物安全,对人畜和生态环境无害,在害虫综合治理中具有广阔的应用前景(江定心等, 2004)。本研究结果显示,黄皮种子提取物对斜纹夜蛾幼虫具有较强的拒食活性,主要活性成分为黄皮新肉桂酰胺 B。黄皮新肉桂酰胺 B 为淡黄色晶体状物质,理化性质较为稳定,易于提取分离,作为植物源农药开发利用有许多独特的优点。一是来源于常用中草药黄皮核,对人类毒性低或无毒,甚至有报道认为多种黄皮酰胺类物质对人体具有抗老年痴呆、保肝、促智及抗神经细胞凋亡等功效(薛薇等, 2008);二是作用方式多样,具有广泛的抑菌及害虫拒食和毒杀等作用。刘艳霞等(2009)研究发现,黄皮新肉桂酰胺 B 对芒果炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 和香蕉枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* 具有很好的抑菌活性,在 0.8 mg/mL 浓度下,菌丝生长抑制率分别为 83.33% 和 60.78%。马伏宁等(2009)研究表明,黄皮新肉桂酰胺 B 对松材线虫有较强的毒杀活性,处理后 24, 48 和 72 h 的 LC_{50}值分别为 8.38, 6.36和 5.38 mg/L。将黄皮新肉桂酰胺 B 制成纳米微乳剂或纳米胶囊后,能显著提高其杀线虫效果,对南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*、爪哇根结线虫 *Meloidogyne javanica* 和香蕉穿孔线虫 *Radopholus similis* 也有较好的防治效果(齐振华等, 2010, 2015; Yin *et al*., 2012)。Han 等(2013)发现,黄皮新肉桂酰胺 B 对淡色库蚊幼虫也有较好的毒杀作用,24 h LC_{50}为 0.45 μg/mL。张瑞明等先后报道了黄皮提取物对米象均有较好的触杀活性(张瑞明等, 2011a),对茶黄蓟马也有较好的驱避和触杀活性(张瑞明等, 2011b),对朱砂叶螨具有良好的触杀驱避和产卵抑制活性(张瑞明等, 2013)。沈丽红等(2015)也研究发现,黄皮酰胺 B 对小菜蛾 *Plutella xylostella* 和朱砂叶螨有较好的毒杀效果,而(*E*)-N-甲基肉桂酰胺对小菜蛾、桃蚜 *Myzus persicae* 和朱砂叶螨毒杀效果好。本研究发现,黄皮新肉桂酰胺 B 对斜纹夜蛾有较强的拒食和细胞毒性,因此,可作为植物源拒食剂开发利用。

以植物次生代谢活性物质为模板进行结构优化是新农药创制研究的重要途径之一。黄皮新肉桂酰胺 B 作为黄皮种子主要杀虫活性成分,同时具有抑菌、拒食和毒杀等多种农用生物活性,尤其是毒杀效果显著。本研究发现,其对斜纹夜蛾离体培养卵巢细胞的毒性显著优于同药量的鱼藤酮。鱼藤酮是具有良好触杀活性的植物源杀虫剂,对斜纹夜蛾卵巢细胞表现出一定的细胞毒性(童松等, 2010; 温好菊等, 2012)。12′-羟基鱼藤酮能通过对斜纹夜蛾卵巢细胞的毒杀活性,导致一些卵巢细胞死亡,从而引起卵巢萎缩、生殖力降低(李有志等, 2009)。黄皮新肉桂酰胺 B 能否直接作用斜纹夜蛾卵巢组织从而影响其生殖力有待进一步深入研究。鉴于黄皮新肉桂酰胺 B 作用方式多样;结构简单,易于仿生合成和活性改造,可作为新型高效杀虫剂或种衣剂模板进行进一步研究。

参考文献(References)

Cheng DM, Zhang ZX, 2003. The research advance in the bioactivity of botanical insecticides against the *Spodoptera litura*. *Journal of Zhongkai Agrotechnical College*, 16(2): 65-72. [程东美, 张志祥, 2003. 植物性杀虫剂对斜纹夜蛾的生物活性研究进展. 仲恺农业技术学院学报, 16(2): 65-72]

Han Y, Li LC, Hao WB, Tang M, Wan SQ, 2013. Larvicidal activity of lansiumamide B from the seeds of *Clausena lansium* against *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasitol. Res*., 112(2): 511-516.

Jiang DX, Xu HH, Hou H, 2004. Botanical insect antifeedants and its application in integrated pest management. *World Pesticides*, 26(3): 6-8. [江定心, 徐汉虹, 侯慧, 2004. 植物源昆虫拒食剂及其在 IPM 中的应用. 世界农药, 26(3): 6-8]

Li YZ, Yang HJ, Xu HH, Liu ZH, Gao BD, Zhang RF, Zhou ZC, 2009. Effect of 12a-hydroxyrotenone on the fecundity of *Prodenia litura* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) and its mechanisms. *Acta Entomologica Sinica*, 52(3): 267-273. [李有志, 杨海君, 徐汉虹, 刘仲华, 高必达, 张瑞峰, 周志成, 2009. 12a-羟基鱼藤酮对斜纹夜蛾生殖力的影响及其作用机理. 昆虫学报, 52(3): 267-273]

Lin JH, 1989. Cinnamamide derivatives from *Clausena lansium*. *Phytochemistry*, 28(2): 621-622.

Ling B, Wang GC, Ya J, Zhang MX, Liang GW, 2008. Studies on antifeeding activity and active ingredients against *Plutella xylostella* from *Momordica charantia* leaves. *Scientia Agricultura Sinica*, 41(10): 3116-3122. [凌冰, 王国才, 轧霁, 张茂新, 梁广文, 2008. 苦瓜叶提取物对小菜蛾的拒食活性及有效成分研究. 中国农业科学, 41(10): 3116-3122]

Liu YX, Gong ZY, Wan SQ, 2009. Inhibitory effects of clausenamide alkaloid on seven fruit pathogenic fungi. *Plant Protection*, 35(5): 53-56. [刘艳霞, 巩自勇, 万树青, 2009. 黄皮酰胺类生物碱的提取及对 7 种水果病原真菌的抑菌活性. 植物保护, 35(5): 53-56]

Ma FN, Wan SQ, Liu XM, Zhao F, 2009. Active ingredients of seed

extracts of *Clausena lansium* and nematocidal activity against *Bursaphelenchus xylophilus*. *Journal of South China Agricultural University*, 30(1): 23 –26. [马伕宁，万树青，刘序铭，赵凤，2009. 黄皮种子中杀松材线虫成分分离及活性测定. 华南农业大学学报, 30(1): 23 –26]

Qi ZH, Wan SQ, Zheng XL, Zhang SQ, Xu CL, Xie H, 2010. Study on nano-microemulsion of clausenamide and the nematicidal efficacy against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica*. *Journal of Northwest A&F University* (*Natural Science Edition*), 38(9): 95 –102. [齐振华，万树青，郑小玲，张森泉，徐春玲，谢辉，2010. 黄皮酰胺纳米微乳剂的制备和特性及其对爪哇根结线虫杀线活性的测定. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 38(9): 95 –102]

Qi ZH, Wang DW, Zhou CN, Zheng XL, Xu CL, Xie H, 2015. The nematicidal activity and control efficiency of clausenamide nano - microemulsion against *Radopholus similis*. *Journal of Southwest University* (*Natural Science Edition*), 37(7): 82 –88. [齐振华，王东伟，周春娜，郑小玲，徐春玲，谢辉，2015. 黄皮酰胺纳米微乳剂对香蕉穿孔线虫的杀线活性和防治效果. 西南大学学报(自然科学版), 37(7): 82 –88]

Qin JD, Wang CZ, 2001. The relation of interaction between insects and plants to evolution. *Acta Entomologica Sinica*, 44(3): 360 –365. [钦俊德，王琛柱，2001. 论昆虫与植物的相互作用和进化的关系. 昆虫学报, 44(3): 360 –365]

Shen LH, Jiao J, Wang Y, Song YQ, Xu YN, Sun H, 2015. The extraction and separation of agricultural active constituents in *Clausena lansium*. *Agrochemicals*, 54(1): 39 –41. [沈丽红，焦姣，王远，宋玉泉，徐亚男，孙慧，2015. 黄皮果中农用成分的提取和分离. 农药, 54(1): 39 –41]

Tong S, Xu HH, Zhang ZX, 2010. Effects of capsaicin on proliferation and apoptosis of *Spodoptera litura* cells. *Acta Phytophylacica Sinica*, 37(5): 466 –470. [童松，徐汉虹，张志祥，2010. 辣椒碱对斜纹夜蛾细胞增殖及凋亡的影响. 植物保护学报, 37(5): 466 –470]

Wan SQ, Zheng DR, 2005. Study on the photoactivited toxicity of several plant extracts to *Lipaphis erysimi* (Kaltenbach). *Plant Protection*, 31(6): 55 –57. [万树青，郑大睿，2005. 几种植物提取物对萝卜蚜的光活化杀虫活性. 植物保护, 31(6): 55 –57]

Wen HJ, Song XN, Zhang ZX, Cheng DM, Zhang QP, 2012. Effects of essential oil on the cytotoxicity of rotenone and capsaicin against *Spodoptera litura* cultured cell line SL-1 *in vitro*. *Journal of South China Agricultural University*, 33(4): 453 –459. [温好菊，宋香宁，张志祥，程东美，张清鹏，2012. 植物精油对鱼藤酮和辣椒碱在斜纹夜蛾离体培养细胞系 SL-1 中活性的影响. 华南农业大学学报, 33(4): 453 –459]

Xue W, Zhang W, Chen NH, 2008. Advances in the study of chiral clausenamide. *Chinese Journal of New Drug*, 17(4): 268 –271. [薛薇，张威，陈乃宏，2008. 手性黄皮酰胺的研究进展. 中国新药杂志, 17(4): 268 –271]

Yin YH, Guo QM, Han Y, Wang LJ, Wan SQ, 2012. Preparation, characterization and nematicidal activity of lansiumamide B nano-capsules. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(7): 1151 –1158.

Zhang RM, Zhao DX, Wan SQ, 2011a. Bioactivity of the methanol extract from *Clausena lansium* seed against *Sitophilus oryzae*. *Agrochemicals*, 50(1): 75 –77. [张瑞明，赵冬香，万树青，2011a. 黄皮种子甲醇提取物对米象的生物活性. 农药, 50(1): 75 –77]

Zhang RM, Zhao DX, Wan SQ, 2011b. Bioactivities of the methanol extract from *Clausena lansium* seeds against *Scirtothrips dorsalis*. *Plant Protection*, 37(3): 120 –123. [张瑞明，赵冬香，万树青，2011b. 黄皮种子甲醇提取物对茶黄蓟马的生物活性. 植物保护, 37(3): 120 –123]

Zhang RM, Zhao DX, Wan SQ, 2013. Bioactivity of *Clausena lansium* seed extracts against *Tetranychus cinnabarinus*. *China Plant Protection*, 33(10): 5 –9. [张瑞明，赵冬香，万树青，2013. 黄皮种子提取物对朱砂叶螨的生物活性. 中国植保导刊, 33(10): 5 –9]

Zhang ZX, Xu HH, Cheng DM, Wu YL, Fan JF, 2000. Screening derivatives of spiro enol ether and testing its toxicity on *Spodoptera litura* cell with MTT method. *Journal of South China Agricultural University*, 21(3): 29 –32. [张志祥，徐汉虹，程东美，吴毓林，范俊发，2000. 利用 MTT 法以茼蒿素类似物对昆虫细胞毒力筛选及测定. 华南农业大学学报, 21(3): 29 –32]

（责任编辑：赵利辉）